

Вестник РГМУ. Опубликовано online 27.10.2020. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.064

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-РВ

Е. С. Ворошилина^{1,2}✉, Д. Л. Зорников¹, А. В. Иванов^{3,4}, Д. Г. Почерников⁵, Е. А. Паначева^{1,2}

Информация об авторах

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

³ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

⁴ Институт математики и механики имени Н. Н. Красовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

⁵ Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия

Микробиота эякулята до сих пор недостаточно изучена, а клиническая значимость выявления отдельных групп микроорганизмов окончательно не установлена. Целью работы было провести кластерный анализ микробиоты эякулята, выявленной методом ПЦР-РВ. С помощью теста «Андрофлор» («ДНК-Технология») исследовали 634 образца эякулята мужчин репродуктивного возраста. Микробную ДНК в количестве не менее 10^3 ГЭ/мл обнаружили в 460 (72,5%) образцов. В 350 (55,2%) пробах выявили от 1 до 14 групп микроорганизмов в надпороговых значениях (частота выявления отдельных групп составила 3,3–21,0%). Среди 350 образцов выделили четыре устойчивых кластера микробиоты, в каждом из которых преобладала определенная группа микроорганизмов: облигатных анаэробов (кластер 1, $n = 172$; частота выявления — 49,1%), *Lactobacillus spp.* (кластер 2, $n = 78$; частота выявления — 22,3%) грамположительных факультативных анаэробов (кластер 3, $n = 62$; частота выявления — 17,7%), *Enterobacteriaceae/Enterococcoccus* (кластер 4, $n = 38$; частота выявления — 10,9%). Кластер 1 характеризовался меньшей устойчивостью и большим видовым разнообразием в сравнении с другими кластерами.

Ключевые слова: кластерный анализ, ПЦР-РВ, микробиота эякулята, спермограмма

Информация о статье

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (протокол № 7 от 20 сентября 2019 г.). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования.

Благодарности: авторы благодарят директора медицинского центра «Гармония» (г. Екатеринбург) В. Н. Хяютина за возможность выполнения исследования на базе центра.

Вклад авторов: Е. С. Ворошилина — организация исследования, анализ данных, написание статьи; Д. Л. Зорников — анализ данных, написание статьи; А. В. Иванов — статистическая обработка, анализ данных, написание статьи; Д. Г. Почерников — клиническая характеристика пациентов, сбор клинических данных, анализ данных, написание статьи; Е. А. Паначева — анализ литературы, проведение ПЦР, анализ данных, написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Сергеевна Ворошилина
ул. Фурманова, д. 30, г. Екатеринбург, 620142; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 21.09.2020 **Статья принята к печати:** 09.10.2020

В сравнении с микробиотой других биотопов тела человека, микробиота урогенитального тракта (УГТ) мужчин, в том числе семенной жидкости, до сих пор остается недостаточно изученной [1]. Долгое время эякулят у здоровых мужчин считали стерильной жидкостью, а обнаружение микроорганизмов (МО) ассоциировали с наличием патологии. Тем не менее недавние исследования демонстрируют наличие микробиоты в эякуляте, в том числе у пациентов без воспалительной патологии УГТ и с нормальными показателями спермограммы [1–7]. Было показано, что микробиота эякулята может быть представлена полимикробными сообществами из представителей разных родов и даже филумов бактерий [1, 2, 5, 7]. Некоторые авторы делают сдержанные выводы об ассоциации отдельных групп МО с нормой и патологией [1, 2, 5]. Часть исследователей считают, что именно наличие определенных ассоциаций МО, а не отдельных их видов, связано с развитием воспалительной патологии УГТ [4].

Данные результаты были получены благодаря внедрению молекулярно-генетических методов исследования, так как многие обнаруживаемые в эякуляте МО являются трудно- или некультивируемыми (в том числе облигатно анаэробные бактерии, редко выявляемые при рутинном культуральном исследовании) [4, 7, 8]. Однако клиническая значимость выявления данных групп МО в эякуляте окончательно не установлена.

В подавляющем большинстве работ по изучению микробиоты эякулята использовали метод NGS (целевой участок бактериального генома — ген 16S рРНК) [1–5, 7].

При высокой информативности этот подход обладает рядом недостатков: сложной пробоподготовкой, трудностью контроля взятия материала, длительной продолжительностью анализа, сложностью интерпретации результатов, высокой стоимостью приборной базы и реагентов для исследования. Данные недостатки делают практически невозможным применение NGS в рутинной врачебной практике. Для этой цели гораздо более удобен метод количественной ПЦР (ПЦР в реальном времени, или

ПЦР-РВ). В нескольких предыдущих исследованиях была показана возможность использования коммерческого набора «Андрофлор» (набор для проведения ПЦР-РВ на 24 группы МО) для оценки микробиоты эякулята [9–11], в том числе его большая информативность в сравнении с культуральным исследованием [10]. При очевидных преимуществах ПЦР-РВ исследования эякулята перед другими микробиологическими методами главным сдерживающим фактором для его внедрения в рутинную практику является сложность практической интерпретации полученных результатов.

При культуральном исследовании клинически значимым порогом выявления условно-патогенной флоры является количество 103 КОЕ в 1 мл [12]. Высокая чувствительность молекулярных методов и способность выявлять некультивируемые и нежизнеспособные формы МО затрудняют использование аналогичных пороговых значений при интерпретации результатов, полученных методом ПЦР-РВ. Необходимо установить, насколько типично присутствие некультивируемых МО в надпороговых значениях в эякуляте в норме и при патологии. При выявлении нескольких групп МО требуется определить устойчивые типы бактериальных сообществ, ассоциированные с нарушениями фертильности у мужчин.

Для ответа на эти вопросы необходимо проведение комплексного анализа результатов молекулярно-биологических и клинических исследований эякулята пациентов с нарушением фертильности и здоровых мужчин. Целью исследования было провести кластерный анализ микробиоты эякулята, выявленной методом ПЦР-РВ (тест «Андрофлор»).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группы обследованных пациентов

В период с января 2019 г. по март 2020 г. были исследованы образцы эякулята 634 мужчин (средний возраст — $34 \pm 6,7$ года). Пациенты обратились в указанный период в Медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург, $n = 429$) и в урологическую клинику Ивановской государственной медицинской академии (г. Иваново, $n = 205$) по поводу бесплодия или для прегравидарной подготовки.

Критерии включения пациентов в исследование: мужчины репродуктивного возраста; наличие бесплодия или проведение прегравидарной подготовки; все обследуемые пациенты в течение последних четырех недель не получали вещества, способные повлиять на микробиом эякулята, такие как гормональные, антибактериальные препараты, а также вещества с содержанием алкоголя более 30 мл в пересчете на чистый этанол.

Критерии исключения из исследования: наличие гипогонадотропного и гипергонадотропного гипогонадизма, сахарного диабета 1-го и 2-го типов, гипо- и гипертиреоза; наличие инфекций, передающихся половым путем (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*); клинические проявления простатита, такие как боль и дизурия; наличие аномалий кариотипа, мутаций в гене CFTR, микроделеций в AZF- локусе Y-хромосомы.

Техника получения эякулята

Подготовка к сбору эякулята: половое воздержание в течение 2–5 дней. Сбор эякулята пациенты осуществляли после мочеиспускания путем мастурбации в стерильный контейнер, избегая касания стенок и крышки контейнера руками.

Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали набор ПРОБА-НК-ПЛЮС («ДНК-Технология»; Россия). Образцы эякулята подвергали предварительной обработке по следующей методике: 1,0 мл эякулята помещали в пробирку Эппендорф с 1,0 мл транспортной среды («Транспортная среда с муколитиком», «ИнтерЛабСервис»; Россия), встряхивали на вортексе до полного перемешивания. Пробирку центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге Mini-Spin (Eppendorf; Германия). После удаления надосадочной жидкости 50 мкл осадка использовали для последующего выделения ДНК.

Оценка микробиоты эякулята

Исследование проводили с использованием набора реагентов «Андрофлор» («ДНК-Технология»; Россия) в детектирующем амплификаторе «ДТпрайм» согласно инструкции производителя. После реакции амплификации по показателю индикаторного цикла с помощью специального программного обеспечения («ДНК-Технология»; Россия) проводили автоматический расчет количества общей бактериальной массы (ОБМ), лактобацилл и каждого из условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в представленном образце (выражали в геномэквивалентах на 1 мл (ГЭ/мл)). Спектр определяемых набором МО представлен следующими группами: грамположительные факультативно-анаэробные МО (*Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*); грамотрицательные факультативно-анаэробные МО (*Haemophilus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* / *Ralstonia spp.* / *Burkholderia spp.*); группа *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus spp.*; облигатно-анаэробные микроорганизмы (*Gardnerella vaginalis*, *Eubacterium spp.*, *Sneathia spp.* / *Leptotrichia spp.* / *Fusobacterium spp.*, *Megasphaera spp.* / *Veillonella spp.* / *Dialister spp.*, *Bacteroides spp.* / *Porphyromonas spp.* / *Prevotella spp.*, *Anaerococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.* / *Parvimonas spp.*, *Atopobium cluster*), микоплазмы (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*), группа *Lactobacillus spp.*, грибы рода *Candida*.

В качестве отрицательного контрольного образца использовали стерильную деионизированную воду. В отрицательном контрольном образце положительные сигналы по некоторым группам МО в ПЦР-РВ фиксировали не ранее 35 цикла амплификации (что соответствовало микробной нагрузке менее 103 ГЭ/мл). На основании этого значимым считали количество МО не менее 103 ГЭ/мл, что соответствовало положительному сигналу в ПЦР-РВ до 35 цикла. Исключение составляли *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, по которым положительный сигнал в отрицательном контрольном образце отсутствовал. При получении сигнала на любом цикле амплификации результат ПЦР-РВ по этим группам МО расценивали как положительный. Грибы рода *Candida* в данном исследовании не учитывали.

Статистические методы

Анализ структурных особенностей микробиоты эякулята проводили с использованием модели кластеризации MSSC, минимизирующей сумму по всем кластерам внутрикластерных сумм квадратов расстояний от элементов кластеров до их центроидов [13]. Решение задачи кластеризации проводили с использованием алгоритма *k-means++* [14], реализованного в библиотеке машинного обучения scikit-learn. Выбор оптимальной кластеризации проводили на основе внутренних оценок качества кластеризации: индекса силуэта [15] и индекса Дэвиса–Болдуина [16]. Для оптимальной кластеризации исследована устойчивость кластеров к изменению размера выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частота выявления отдельных групп МО

ОБМ в надпороговом количестве (не менее 10^3 ГЭ/мл) определяли в 460 (72,5%) из 634 проб. Из них в 110 (17,4%) образцах число всех отдельных групп МО было ниже установленного порога. В 174 (27,5%) пробах бактериальная ДНК присутствовала в количестве менее 10^3 ГЭ/мл.

В 350 (55,2%) образцах одновременно выявляли от 1 до 14 групп МО в надпороговых значениях. Частота выявления отдельных групп МО представлена в табл. 1.

Разные группы МО встречались во множестве ассоциаций друг с другом. Поэтому было принято решение провести кластерный анализ с целью определения характерных для эякулята микробных сообществ.

Кластерный анализ микробиоты эякулята

Для проведения кластерного анализа были отобраны 350 проб, отвечающие следующим критериям: ОБМ не менее 10^3 ГЭ/мл, как минимум одна группа МО не менее 10^3 ГЭ/мл.

Для запуска алгоритма кластеризации *k-means++* каждый исследуемый образец был представлен в виде вектора $(p, s) \in R50$, состоящего из вектора первичных признаков $p \in R19$, взятых из данных исследований микробиоты эякулята методом ПЦР-РВ, и вектора вторичных признаков $s \in R31$, рассчитываемых на основе первичных признаков.

Первичными признаками являлись абсолютные значения показателей, определяемых тестом «Андрофлор» (ОБМ и 18 групп МО).

На основе первичных признаков были рассчитаны следующие вторичные признаки: скорректированная ОБМ (СОБМ), равная суммарной массе 18 определяемых групп МО; массовые доли МО по отношению к СОБМ; массы укрупненных в соответствии с компоновкой теста «Андрофлор» групп МО: *Lactobacillus spp.*, грамположительных факультативных анаэробов (ГПФА), облигатных анаэробов (ОА), грамотрицательных факультативных анаэробов (ГОФА), *Enterobacteriaceae spp. / Enterococcus spp.* (ЕЕ) и микоплазм; массовые доли укрупненных групп МО по отношению к СОБМ.

Определение оптимального количества кластеров в исследуемом наборе данных проводили на основе значений индексов силуэта и Дэвиса–Болдуина (табл. 2).

Наилучшему качеству кластеризации соответствуют наибольшее значение индекса силуэта и наименьшее значение индекса Дэвиса–Болдуина. В соответствии с полученными значениями индексов оптимальным было выделение четырех основных кластеров микробиоты эякулята.

Каждый из полученных кластеров отличался преобладанием определенной укрупненной группы МО. На рис. 1 представлены диаграммы размаха признаков объектов, попавших в соответствующий кластер.

Кластер 1 — вариант с преобладанием ОА. Абсолютное количество всех ОА было сопоставимо с ОБМ и составило в центроиде 104,3 ГЭ/мл (рис. 1А). Доля ОА в центроиде достигала 82,8% относительно СОБМ. Данный вариант микробиоты определяли в 172 (49,1%) из 350 образцов.

Кластер 2 — вариант с преобладанием *Lactobacillus spp.* В образцах, отнесенных к данному кластеру, абсолютное количество *Lactobacillus spp.* было сопоставимо с СОБМ и составило в центроиде 104,0 ГЭ/мл (рис. 1Б). Доля *Lactobacillus spp.* в центроиде достигала 80,9% относительно СОБМ. Данный вариант микробиоты эякулята идентифицировали в 78 (22,3%) из 350 образцов.

Кластер 3 — вариант с преобладанием ГПФА. Абсолютное количество всех ГПФА было сопоставимо с СОБМ и в центроиде составило 103,6 ГЭ/мл (рис. 1В). Доля ГПФА в центроиде составила 89,4% относительно СОБМ. Данный вариант микробиоты выявляли в 62 (17,7%) из 350 образцов.

Кластер 4 — вариант с преобладанием группы ЕЕ. Абсолютное количество всех ЕЕ было ниже количества СОБМ и составило в центроиде 103,5 ГЭ/мл (рис. 1Г). Доля ЕЕ в центроиде составила 64,5% относительно СОБМ. Данный вариант микробиоты эякулята был определен в 38 (10,9%) из 350 образцов.

Анализ устойчивости микробных кластеров

Для исследования устойчивости выделенных кластеров генерировали подвыборки образцов объема $f = 1,100\%$ от исходной выборки (1000 случайных подвыборок без возврата на каждое значение объема). Для сгенерированных подвыборок проводили процедуру разбиения на четыре кластера. Для каждой ($m = 1,1000$) сгенерированной подвыборки образцов объема f (обозначим такую подвыборку через X) рассчитывали индекс устойчивости кластера k по следующей формуле:

где n — количество образцов в подвыборке X ; $1_{\{true\}}$;

$\{false\} \rightarrow \{0,1\}$ индикаторная функция логического аргумента; $x \in X$ — образец из подвыборки X , $A(x)$; $A^m(x)$ — метка кластера, в который попал образец x в результате кластеризации исходного набора образцов и подвыборки X , соответственно; $k = \{1, 2, 3, 4\}$, $I = \{1, 2, 3, 4\}$ метки кластеров.

Дополнительно рассчитывали индекс устойчивости кластера k , общий для подвыборок объема f . Расчет проводили по следующей формуле:

Графики индексов устойчивости кластеров, рассчитанных по формулам (1) и (2), представлены на рис. 2. Полученные четыре кластера устойчивы: на достаточно небольших объемах подвыборок вероятность отнесения двух произвольных наблюдений к одному и тому же кластеру при 4-кластеризации исходной выборки и произвольной подвыборки стремится к 1. Наиболее устойчивы кластеры с преобладанием *Lactobacillus spp.* (кластер 2; рис. 2Б), с преобладанием ГПФА (кластер 3; рис. 2В) и с преобладанием ЕЕ (кластер 4; рис. 2Г). Наименее устойчив кластер 1 с преобладанием ОА (рис. 2А).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокая чувствительность метода ПЦР и присутствие бактериальной ДНК как в окружающей среде, так и в реагентах для проведения анализа (Kitome) являются ограничивающими факторами для интерпретации результатов исследования образцов с низкой микробной нагрузкой [17]. Учитывая, что при исследовании отрицательного контрольного образца для большинства групп МО после 35 цикла в ПЦР-РВ (что соответствовало микробной нагрузке менее 10^3 ГЭ/мл) были получены положительные сигналы, в качестве порогового значения был взят показатель 10^3 ГЭ/мл. Все остальные результаты рассматривали как отрицательные. Исключение составляли группы *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, по которым положительный сигнал в отрицательном контрольном образце отсутствовал. При получении сигнала на любом цикле амплификации результат ПЦР-РВ по этим группам МО расценивали как положительный.

Наличие микробной нагрузки выше порогового значения отмечали только в 460 (72,5%) пробах. При этом в 110 образцах число всех отдельных групп МО было ниже установленного порога. Почти половина образцов эякулята (44,8%) содержала бактериальную ДНК в подпороговых значениях (менее 10^3 ГЭ/мл), что принято рассматривать как вариант нормы [12].

В 350 (55,2%) образцах одновременно обнаруживали от 1 до 14 групп МО в надпороговых значениях, что согласуется с результатами других исследователей, отмечающих гетерогенность микробиоты эякулята [1, 2, 5, 7]. Чаще других выявляли следующие группы МО: *Corynebacterium spp.* (21,0%), *Bacteroides spp.* / *Porphyromonas spp.* / *Prevotella spp.* (20,7%), *Lactobacillus spp.* (19,7%), *Eubacterium spp.* (17,0%), *Peptostreptococcus spp.* / *Parvimonas spp.* (16,9%). Реже обнаруживали другие группы МО с частотой 3,3–14,8%. Ранее проведенные исследования также показали, что при использовании молекулярно-биологических методов наряду с факультативными анаэробами в эякуляте часто выявляют облигатных анаэробов и *Lactobacillus spp.* [1, 2, 5, 7, 18].

Кластерный анализ микробиоты эякулята в образцах, содержащих надпороговые значения ОБМ и хотя бы одной из групп МО, показал, что оптимально разбиение на четыре кластера. Для каждого кластера было характерно преобладание одной из укрупненных групп МО: для кластера 1 — ОА, для кластера 2 — *Lactobacillus spp.*, для кластера 3 — ГПФА, для кластера 4 — ЕЕ. Схожие данные были получены в ранее проведенных исследованиях, использующих метод NGS для оценки состава микробиоты эякулята [1, 2]. Еще одни авторы при исследовании семенной жидкости здоровых мужчин и мужчин с бесплодием также выделили несколько кластеров МО, в том числе с преобладанием ГПФА, ОА, *Lactobacillus spp.* [2].

Кластер 2 (с преобладанием *Lactobacillus spp.*), кластер 3 (с преобладанием ГПФА) и кластер 4 (с преобладанием ЕЕ) характеризовались высокой устойчивостью. При этом для кластеров 2 и 3 было нетипично присутствие других групп МО в количествах, сопоставимых с образующими кластер группами. Тогда как для кластера 4 было характерно присутствие наряду с ЕЕ других групп бактерий: ГПФА, ОА и грамотрицательных факультативных анаэробов.

Кластер 1 (с преобладанием ОА) характеризовался меньшей устойчивостью, что может быть обусловлено большим видовым разнообразием микробиоты в этих образцах эякулята.

Результаты настоящего исследования подтверждают наблюдения других авторов о гетерогенном составе микробиоты эякулята, которая может быть сгруппирована в ряд кластеров. Примененный нами подход подтвердил устойчивость выделенных четырех кластеров на случайно сгенерированных выборках разного размера.

Предметом дальнейших исследований может стать определение частоты выявления описанных в настоящей работе бактериальных кластеров в образцах эякулята, полученных от пациентов с нормоспермией и различными вариантами патоспермии. Установление взаимосвязи между особенностями микробиоты эякулята и нарушениями фертильности у мужчин позволит выработать новые алгоритмы ведения пациентов с бесплодием в зависимости от состава микробиоты эякулята.

ВЫВОДЫ

1. Методом ПЦР-РВ бактериальную ДНК в количестве не менее 10^3 ГЭ/мл выявляли в 72,5% образцов эякулята; в 55,2% проб эякулята одновременно определяли от 1 до 14 групп МО в надпороговых значениях.
2. Выделили четыре устойчивых кластера микробиоты эякулята, каждый из которых отличался преобладанием определенной укрупненной группы микроорганизмов: ОА, *Lactobacillus spp.*, грамположительных факультативных анаэробов, *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus*.
3. В половине образцов эякулята микробиота была представлена кластером 1 (с преобладанием ОА), для которого характерны наименьшая стабильность и наибольшее видовое разнообразие.

1. Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 2019; 10: 234. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
2. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril.* 2013; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
3. Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, et al. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. *PLoS Pathog.* 2014; 10 (7): e1004262. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004262.
4. Mändar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E, et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol.* 2017; 24 (3): 211–216. DOI: 10.1111/iju.13286.
5. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e110152. DOI:

- 10.1371/journal.pone.0110152.
6. Zozaya M, Ferris MJ, Siren JD, Lillis R, Myers L, Nsuami MJ, et al. Bacterial communities in penile skin, male urethra, and vaginas of heterosexual couples with and without bacterial vaginosis. *Microbiome*. 2016; 4: 16. DOI: 10.1186/s40168-016-0161-6.
 7. Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Parm Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020; 18 (1): 3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
 8. Kiessling AA, Desmarais BM, Yin HZ, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril*. 2008; 90 (5): 1744–56. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.083.
 9. Почерников Д. Г., Галкина И. С., Постовойтенко Н. Т., Герасимов А. М. Сравнительный анализ биотопа эякулята и цервикального канала методом ПЦР-РВ с тестами «Андрофлор» и «Фемофлор» в супружеских парах. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2017; 2: 37–41.
 10. Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Паначева Е. А. Сравнительное исследование микробиоты эякулята методом количественной ПЦР и культуральным методом. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2019; 1: 44–9.
 11. Почерников Д. Г., Витвицкая Ю. Г., Болдырева М. Н., Галкина И. С. Информативность биоматериала для исследования микробиоты урогенитального тракта мужчин методом ПЦР-РВ (пилотное исследование). *Экспериментальная и клиническая урология*. 2019; 2: 128–33.
 12. Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch Arztebl Int*. 2017; 114 (19): 339–46.
 13. Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data clustering: a review. *ACM computing surveys (CSUR)*. 1999; 31 (3): 264–323.
 14. Arthur D, Vassilvitskii S. K-means++: the advantages of careful seeding. In: Hal Gabow, editor. *Proceedings of the Eighteenth Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms (Proceedings in Applied Mathematics) 18th ed.* Society for Industrial and Applied Mathematics (3 January 2007). P. 1027–1035.
 15. Rousseeuw PJ. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math*. 1987; 20: 53–65.
 16. Davies DL, Bouldin DW. A Cluster Separation Measure. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. PAMI- 1. 1979; (2): 224–27.
 17. de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol*. 2018 Aug; 3 (8): 851–3.
 18. Yang H, Zhang J, Xue Z, Zhao C, Lei L, Wen Y, et al. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dysspermatism. *Sci Rep*. 2020; 10: 6876.